

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (51) Internationale Patentklassifikation 5 : A61K 39/395, C07K 15/28 C12P 21/08, C12N 5/00 | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/12816 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 8. Juli 1993 (08.07.93) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/02905 | | (74) Anwälte: SCHREINER, Siegfried usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Dezember 1992 (15.12.92) | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). |
| (30) Prioritätsdaten: P 41 42 552.9 21. Dezember 1991 (21.12.91) DE | | Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> |
| (71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE). | | |
| (72) Erfinder; und | | |
| (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>) : SCHEUER, Werner [DE/DE]; Barbarastraße 49, D-8122 Penzberg (DE). HÜBNER-PARAJSZ, Christa [AT/DE]; Marienstr. 11, D-8132 Tutzing (DE). TIBES, Ulrich [DE/DE]; Am Sandberg 102, D-6000 Frankfurt 70 (DE). | | |
| (54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST TYPE I PHOSPHOLIPASE A ₂ , USED AS A THERAPEUTIC AGENT TO REDUCE INFLAMMATION | | |
| (54) Bezeichnung: MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN DIE TYP I-PHOSPHOLIPASE A ₂ ALS ENTZÜNDUNGS-HEMMENDES THERAPEUTIKUM | | |
| (57) Abstract | | |
| The invention concerns the use of monoclonal antibodies against type I phospholipase A ₂ in the preparation of a therapeutic agent to reduce inflammation. This agent is particularly suitable for use in cases of acute pancreatitis. | | |
| (57) Zusammenfassung | | |
| Die Erfindung betrifft die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A ₂ zur Herstellung eines entzündungshemmenden Therapeutikums, das sich insbesondere zur Anwendung bei akuter Pankreatitis eignet. | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | FR | Frankreich | MR | Mauritanien |
| AU | Australien | GA | Gabon | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GB | Vereinigtes Königreich | NL | Niederlande |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NO | Norwegen |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NZ | Neuseeland |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | PL | Polen |
| BJ | Benin | IE | Irland | PT | Portugal |
| BR | Brasilien | IT | Italien | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | JP | Japan | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KR | Republik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KZ | Kasachstan | SK | Slowakischen Republik |
| CJ | Côte d'Ivoire | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CM | Kamerun | LK | Sri Lanka | SU | Soviet Union |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TD | Tschad |
| CZ | Tschechischen Republik | MC | Monaco | TG | Togo |
| DE | Deutschland | MG | Madagaskar | UA | Ukraine |
| DK | Dänemark | ML | Mali | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| ES | Spanien | MN | Mongolci | VN | Vietnam |
| FI | Finnland | | | | |

Monoklonale Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂ als entzündungshemmendes Therapeutikum

Die Erfindung betrifft die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A₂ zur Herstellung eines entzündungshemmenden Therapeutikums, das sich insbesondere zur Anwendung bei akuter Pankreatitis eignet.

Für die akute Pankreatitis existiert weder eine kausale noch eine symptomatische Therapie (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy 15 (1987), Seite 763-767). Pathogenetische Grundlage der akuten Pankreatitis ist eine Autolyse des Pankreas. Hierbei wird der Phospholipase A₂ eine entscheidende Funktion zugeschrieben. Sie wirkt lysierend auf die Zellmembran und setzt dabei aus Membranphospholipiden Arachidonsäure frei. Die Metabolite der Arachidonsäure (Prostaglandine und Leukotriene) sind wesentlicher Bestandteil der Entzündungsreaktion.

Die Phospholipase A₂ kommt in zwei Formen vor. Die als Typ I bezeichnete Phospholipase A₂ wird im wesentlichen im Pankreasgewebe gefunden und spielt bei der akuten Pankreatitis eine entscheidende Rolle. Dagegen ist die Typ II Phospholipase A₂ in vielen verschiedenen Geweben anzutreffen.

- 2 -

In der EP-A 0 248 597 werden niedermolekulare Hemmstoffe der Phospholipase A₂ beschrieben, die eine entzündungshemmende Wirkung bei der Maus aufweisen. Für eine etwa 80 %-ige Hemmung ist jedoch eine Applikation von 200 - 400 µg dieser Verbindungen notwendig. Bei derart hohen Dosierungen schränken Nebenwirkungen dieser niedermolekularen Inhibitoren deren therapeutische Anwendbarkeit deutlich ein. Diesen Nachteil weist auch der in der JP 088193 beschriebene Inhibitor der Phospholipase A₂ auf, der mit einer täglichen Dosierung von 100 bis 1000 mg bei erwachsenen Patienten zur Therapie einer Pankreatitis vorgeschlagen wird. Die in der EP-A 0 405 864 beschriebenen Phospholipase A₂-Inhibitoren aus dem Mikroorganismus *Circinotrichum falcatisporum* weisen für die Hemmung von gereingter Rattenphospholipase A₂ IC₅₀-Werte von 17,5 bis über 300 µg/ml auf und müßten somit bei einer therapeutischen Anwendung ebenfalls sehr hoch dosiert werden.

Als weiterer Inhibitor der Phospholipase A₂ weist auch das 37 kD große Lipocortin eine entzündungshemmende Wirkung auf (B. Wallner et.al., Nature 320 (1986), 77-81). Wegen seiner geringen Stabilität eignet sich Lipocortin jedoch nicht für eine therapeutische Verwendung. In der EP-A 0 327 334 werden daher 15-26 Aminosäuren große Peptide beschrieben, die eine hemmende Wirkung auf die Phospholipase A₂ aufweisen. Lediglich bei einem dieser Peptide liegt jedoch der IC₅₀-Wert unter 10 µg/ml. Es wird jedoch nicht gezeigt, daß dieses Peptid aus 16 ungeschützten Aminosäuren eine höhere Stabilität als Lipocortin aufweist.

Von K. Takayama et.al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 167 (1990), 1309-1315) werden monoklonale Antikörper gegen die menschliche Phospholipase A₂ aus der Synovialflüssigkeit beschrieben, die jedoch nicht an die Phospholipase A₂ aus dem Pankreas binden.

- 3 -

In EP-A 0 287 397 und J. Clin. Biochem. Nutr. 11 (1991), 79 - 89 werden monoklonale Antikörper gegen die Phospholipase A₂ aus dem Pankreas beschrieben. Einige dieser Antikörper hemmen die enzymatische Aktivität der Phospholipase A₂ mit einer IC₅₀ von 0,2 ng/ml. Es wird jedoch lediglich eine diagnostische Verwendung dieser Antikörper beschrieben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es dagegen, einen Hemmstoff für die Phospholipase A₂ zur Verfügung zu stellen, dessen inhibitorische Wirkung die Verwendung dieses Hemmstoffs als Therapeutikum gegen die akute Pankreatitis ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50 %-ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirken, oder funktioneller Fragmente dieser Antikörper, zur Herstellung eines Therapeutikums, das bei Entzündungserscheinungen, speziell bei akuter Pankreatitis eingesetzt werden kann.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Typ I Phospholipase A₂ oder einem funktionellen Derivat eines solchen Antikörpers ein besonders effizientes Therapeutikum gegen Entzündungsreaktionen, insbesondere gegen akute Pankreatitis, Psoriasis, Peritonitis oder Sepsis erhalten werden kann. Neben den vollständigen Antikörpern sind hierfür auch funktionelle Antikörperfragmente wie monoklonale Fab- oder F(ab')-Fragmente, sowie divalente F(ab')₂-Fragmente geeignet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine pharmazeutische Formulierung, bestehend aus einem monoklonalen

- 4 -

Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂ oder einem funktionellen Derivat dieses Antikörpers, gegebenenfalls zusammen mit den üblichen pharmazeutischen Träger-, Füll-, Hilfs- und Zusatzstoffen, sowie ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Arzneimittels, das insbesondere zur Therapie der akuten Pankreatitis eingesetzt werden kann.

Für die erfindungsgemäße Verwendung haben sich die aus den Hybridomlinien DSM ACC2026 und DSM ACC2025 erhältlichen monoklonalen Antikörper als besonders geeignet erwiesen.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind daher monoklonale Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die in äquivalenter Weise an die Typ I-Phospholipase A₂ bindefähig sind, wie die aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlichen monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂.

Unter dem Begriff "in äquivalenter Weise bindefähige Antikörper" werden Antikörper verstanden, bei denen eine Epitopüberlappung mit dem definierten bekannten Antikörper nachweisbar ist. Diese Epitopüberlappung kann mit Hilfe eines kompetitiven Testsystems leicht nachgewiesen werden. Dazu wird zum Beispiel mit Hilfe eines Enzymimmunoassays überprüft, in wie weit ein Antikörper mit dem bekannten Antikörper um die Bindung an ein definiertes Antigen bzw. ein spezielles Epitop konkurriert. Dazu inkubiert man das entsprechende Antigen mit dem bekannten monoklonalen Antikörper in markierter Form und einem Überschuß des in Betracht gezogenen Antikörpers. Durch Immobilisierung der gebildeten Komplexe, Trennung der festen von der flüssigen Phase und Nachweis der gebundenen Markierung in einer der beiden Phasen, kann dann leicht festgestellt werden, in wie weit der in Betracht gezogene Antikörper den definierten Antikörper

- 5 -

aus der Bindung verdrängen kann. Ist eine Verdrängung von mindestens 50 % bei 10^5 -fachen Überschuß gegeben, so liegt eine Epitopüberlappung vor.

Besonders bevorzugt sind die monoklonalen Antikörper gegen die Typ I-Phospholipase A₂, die aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlich sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper sind erhältlich durch Immunisierung mit gereinigter Phospholipase A₂, Immortalisieren von Milzzellen der immunisierten Tiere und Klonierung derjenigen immortalisierten Zellen, deren Kulturüberstand einen Antikörper enthält, der eine Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ mit einer IC₅₀ von weniger als 100ng/ml bewirkt. Die von diesen Klonen produzierten monoklonalen Antikörpern werden dann nach bekannten Verfahren isoliert.

Die Immunisierung wird in den hierfür üblicherweise verwendeten Tieren wie z.B. Mäusen oder Ratten durchgeführt. Vorzugsweise werden Mäuse verwendet.

Die Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere erfolgt vorzugsweise durch Fusionierung mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag 8.653 (ATCC CRL 1580) gemäß der Methode nach J. of Imm. Meth. 39 (1980), 285-308. Daneben können aber auch andere, dem Fachmann geläufige Verfahren zur Immortalisierung der Milzzellen verwendet werden.

Zur Klonierung werden die Zellen zum Beispiel mittels eines floureszenzsaktivierten Zellsorters vereinzelt. Zum Nachweis

- 6 -

von immortalisierten Zellen, die den gewünschten Antikörper gegen Phospholipase A₂ produzieren, wird eine Probe des Kulturüberstandes in einem ELISA-Test auf Reaktivität mit der Phospholipase A₂ getestet. Um solche Antikörper zu erhalten, welche die enzymatische Aktivität der Phospholipase A₂ hemmen, wird der Kulturüberstand derjenigen Klone, die an die Phospholipase A₂ bindende Antikörper produzieren, zusätzlich auf die Hemmung der Phospholipase A₂-Aktivität in einem enzymatischen Test untersucht.

Diejenigen Klone, deren Kulturüberstand die gewünschte Hemmung der Phospholipase A₂-Aktivität ergibt, werden expandiert und die von diesen Klonen produzierten Antikörper nach bekannten Verfahren isoliert.

Die einen erfundungsgemäßen monoklonalen Antikörper gegen die Phospholipase A2 produzierenden Hybridomzelllinien DSM ACC2026 und DSM ACC2025 wurden am 10.12.1991 bei der Deutschen Sammlung von Zellkulturen und Mikroorganismen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-3300 Braunschweig, hinterlegt.

Die Erfahrung wird durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit der Figur 1 erläutert.

Figur 1 zeigt die Hemmung der Phospholipase A₂-Aktivität durch die monoklonalen Antikörper DSM ACC2026 (+) und DSM ACC2025 (□).

- 7 -

Beispiel 1:

**Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen die Typ I-
Phospholipase A₂**

12 Wochen alte Balb/C-Mäuse werden intraperitoneal mit 50 µg gereinigter Phospholipase A₂ (EC 3.1.1.4, V. Kozumplik et al., Biochim. Biophys. Acta 1002 (1989), 395 – 397) in komplettem Freund's Adjuvans immunisiert. Zwei nachfolgende Injektionen von jeweils 50 µg werden im Abstand von jeweils einem Monat mit inkomplettem Freund's Adjuvans gegeben. 3 Tage vor der Zellfusion erfolgt eine intravenöse Injektion von weiteren 50 µg in physiologischer Kochsalzlösung.

Die Fusion der Milzzellen der immunisierten Mäuse mit der Myelomzelllinie P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580) erfolgt gemäß einer Modifikation der ursprünglich von Köhler und Milstein beschriebenen Methode (J. of Imm. Meth. 39 (1980), 285-308). Die fusionierten Zellen werden in RPMI 1640 Medium (das 10 % FKS, 2 mmol/l L-Glutamin und 1 mmol/l Natriumpyruvat, sowie 0,1 mmol/l Hypoxantin und 10 µmol/l Azaserin enthält) kultiviert.

Positive Primärkulturen (Bestimmung gemäß Beispiel 2 und 3) werden 2 Wochen nach Fusion mit Hilfe eines floureszenzaktivierte Zellsorters kloniert. Die Zellen werden dabei einzeln in 96-er Mikrotiterplatten abgelegt.

- 8 -

Beispiel 2:

Bestimmung der Spezifität der produzierten Antikörper

Um die Spezifität der Antikörper im Kulturüberstand der Hybridomzellen zu erfassen, wird ein Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewendet.

Dazu werden 96-er Mikrotiterplatten mit 100 µl Phospholipase A₂ Antigen (5 µg/ml in Carbonatpuffer, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 726 559) beschichtet, mit 100 µl Kulturüberstand (1:25 mit PBS (nach Dulbecco und Vogt, J. Exp. Meth. 99 (1954), 167-182) verdünnt) 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und mit 3 x 350 µl PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen. Nach Zugabe der den Antikörper enthaltenden Probelösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gewaschen. Danach wird mit POD-markiertem Schaf-anti-Maus-Immunglobulin G (10 mU, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 13 17 377) 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, mit 3 x 350 µl PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und die Nachweisreaktion durch Zugabe von 100 µl ABTS® (1 mg/ml, Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 756 407) in 40 mmol/l Citratpuffer pH 4,4 der 3,25 mmol/l Natriumperborat enthält (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1204 530) ausgelöst. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Extinktion in einem ELISA-Reader bei 405 nm bestimmt.

Beispiel 3:

Test auf Inhibierung der enzymatischen Aktivität

Humane duodenale Phospholipase A₂ (s. Beispiel 1) wird mit Trispuffer aus der Testkombination "Freie Fettsäuren" (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1056 239) verdünnt.

- 9 -

20 µl dieser Enzymlösung wird 15 min. bei 25°C mit 10 µl der zu untersuchenden Antikörperlösung in verschiedenen Konzentrationen (s. Tab. 1) inkubiert. Anschließend wird 20 µl Substrat (Lecithinemulsion aus der Testkombination "Freie Fettsäuren", Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1056 239) zugegeben und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die hierbei durch die Phospholipase A₂-Aktivität freigesetzten Fettsäuren werden mittels der Testkombination "Freie Fettsäuren" (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1383 175) durch Messung der Extinktion gemäß Angaben des Herstellers quantifiziert. Die Ergebnisse sind in %-Hemmung im Vergleich zur Enzymaktivität ohne Antikörper in der folgenden Tabelle 1, sowie in Figur 1, dargestellt (jeweils Mittelwerte aus 3 Bestimmungen).

Tabelle 1:

| Probe | Konz (µg/ml) | %-Hemmung |
|-------------|-----------------|-----------|
| DSM ACC2025 | 100 | 97 |
| | 10 | 93 |
| | 1 | 86 |
| | 0,1 | 56 |
| | 0,01 | 16 |
| DSM ACC2026 | 100 | 97 |
| | 10 | 94 |
| | 1 | 88 |
| | 0,1 | 56 |
| | 0,01 | 20 |

- 10 -

Beispiel 4:

**Bestimmung der Epitopüberlappung von Antikörpern gegen
Phospholipase A₂**

Zum Nachweis der Epitopüberlappung eines Antikörpers mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC 2025 oder DSM ACC2026 wird ein kompetitiver Enzymimmunoassay durchgeführt.

Dazu wird Phospholipase A₂ zunächst mit D-Biotinyl-ε-amido-capronsäure-N-hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1008 960) gemäß Angaben des Herstellers biotinyliert. Von diesem biotinylierten Antigen werden 300 ng in einem Volumen von 100 µl PBS durch einstündige Inkubation bei Raumtemperatur an eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (Herstellung nach EP-A 0 344 578) gebunden. Nach viermaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 wird 90 Minuten bei Raumtemperatur simultan inkubiert mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026, der mit Peroxidase markiert wurde (Endkonzentration 250 mU/ml) und dem zu beurteilenden Antikörper. Nach erneutem viermaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween 20 wird mit der Enzymsubstratlösung ABTS® in Natriumperborat enthaltendem Puffer (s. Beispiel 2) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 405 nm als Maß für die Menge des gebundenen POD-markierten monoklonalen Antikörpers DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 gemessen. Dieser Wert wird verglichen mit der Extinktion, die erhalten wird, bei Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2025 allein. Wenn bis zum einem 10⁵-fachen Überschuß an zu beurteilendem Antikörper gegenüber dem monoklonalen Antikörper DSM ACC2025 bzw. DSM ACC2026 als Enzymkonjugat (250 mU/ml) mindestens 50 % Kompetition zu erkennen sind, liegt eine Epitopüberlappung vor.

- 11 -

Beispiel 5:

Inhibierung der PLA₂-TypI-induzierten PGE₂- und LTC₄-Ausschüttung durch humane Leukozyten in Gegenwart eines monoklonalen Antikörpers gegen die Phospholipase A₂

Humane Leukozyten werden durch Dichtezentrifugation (Lymphozytentrennmedium der Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 295949) aus peripherem Blut isoliert und auf einen Zelltiter von 0,75 x 10⁶ Zellen/ml in 125 mmol/l Trispuffer aus der Testkombination "Freie Fettsäuren" (Boehringer Mannheim GmbH, Katalog-Nr. 1056 239) eingestellt. Verschiedene Konzentrationen von gereinigter humaner Phospholipase A₂ (siehe Beispiel 1 und Tabelle 2) werden mit einer Lösung des monoklonalen Antikörpers DSM ACC2026 (Konzentration siehe Tabelle 2) und den humanen Leukozyten für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 10 Min. bei 800 g abzentrifugiert und in den Überständen die PGE₂- und LTC₄-Konzentration über einen Radioimmunoassay (Biermann, Bad Nauheim, Deutschland, für PGE₂ und NEN DuPont, Dreieich, Deutschland, für LTC₄) bestimmt. Die Ergebnisse von jeweils zwei unabhängigen Versuchen (humane Leukozyten von zwei verschiedenen Spendern) sind in der nachfolgenden Tabelle 2 angegeben (jeweils Mittelwerte von drei Bestimmungen). In den positiven Kontrollansätzen (Inkubation mit Phospholipase A₂ Typ I, aber ohne monoklonalen Antikörper gegen diese Phospholipase A₂) ist deutlich die PLA₂-induzierte Stimulierung der Ausschüttung der Entzündungsmediatoren PGE₂ und LTC₄ durch humane periphere Lymphozyten zu erkennen. Diese in vivo zu einer Entzündungsreaktion führende Ausschüttung von PGE₂ und LTC₄ kann durch Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen die TypI-Phospholipase A₂ deutlich gehemmt werden.

- 12 -

Tabelle 2

| PLA ₂ -Typ I MAK<PLA ₂ > DSM ACC2026 | | PGE ₂ [ng/ml] | | LTC ₄ [ng/ml] | |
|------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------|--------|-----------------------------|--------|
| | | Exp. 1 | Exp. 2 | Exp. 1 | Exp. 2 |
| - | - | 0,82 | 1,99 | 0,17 | 0,19 |
| 1 mg/ml | - | 5,42 | 9,13 | 0,87 | 0,91 |
| " | 0.1 mg/ml | 2,18 | 4,13 | 0,24 | 0,25 |
| " | 0.01 mg/ml | 3,23 | 5,20 | 0,31 | 0,28 |
| " | 0.001 mg/ml | 4,72 | 8,89 | 0,49 | 0,77 |
| 0,1 mg/ml | - | 2,16 | 4,44 | 0,23 | 0,32 |
| " | 0.1 mg/ml | 0,97 | 2,53 | 0,17 | 0,20 |
| " | 0.01 mg/ml | 1,29 | 2,74 | 0,16 | 0,19 |
| " | 0.001 mg/ml | 1,63 | 3,13 | 0,21 | 0,17 |
| 0,01 mg/ml | - | 1,05 | 2,44 | 0,17 | 0,15 |
| " | 0.1 mg/ml | 0,74 | 2,17 | 0,13 | 0,13 |
| " | 0.01 mg/ml | 0,82 | 1,99 | 0,13 | 0,12 |
| " | 0.001 mg/ml | 0,97 | 1,73 | 0,14 | 0,14 |

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen die Typ I Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50 %-ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt, oder eines funktionellen Fragments dieses Antikörpers zur Herstellung eines Therapeutikums, das bei Entzündungserscheinungen, speziell bei akuter Pankreatitis eingesetzt werden kann.
2. Pharmazeutische Formulierung, bestehend aus einem monoklonalen Antikörper gegen die Typ I Phospholipase A₂, der bei einer Konzentration von weniger als 100 ng/ml eine mindestens 50 %-ige Hemmung der Aktivität der Phospholipase A₂ bewirkt, oder eines funktionellen Fragments dieses Antikörpers gegebenenfalls zusammen mit den üblichen pharmazeutischen Träger-, Füll-, Hilfs- und Zusatzstoffen.
3. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, der in äquivalenter Weise an die Typ-I-Phospholipase A₂ bindefähig ist, wie ein aus den Zelllinien DSM ACC2026 und/oder DSM ACC2025 erhältlicher monoklonaler Antikörper.
4. Monoklonaler Antikörper gegen die Typ-I-Phospholipase A₂, erhältlich aus der Zelllinie DSM ACC2026 oder DSM ACC2025.

- 14 -

5. Zelllinie DSM ACC2026.
6. Zelllinie DSM ACC2025.

1/1

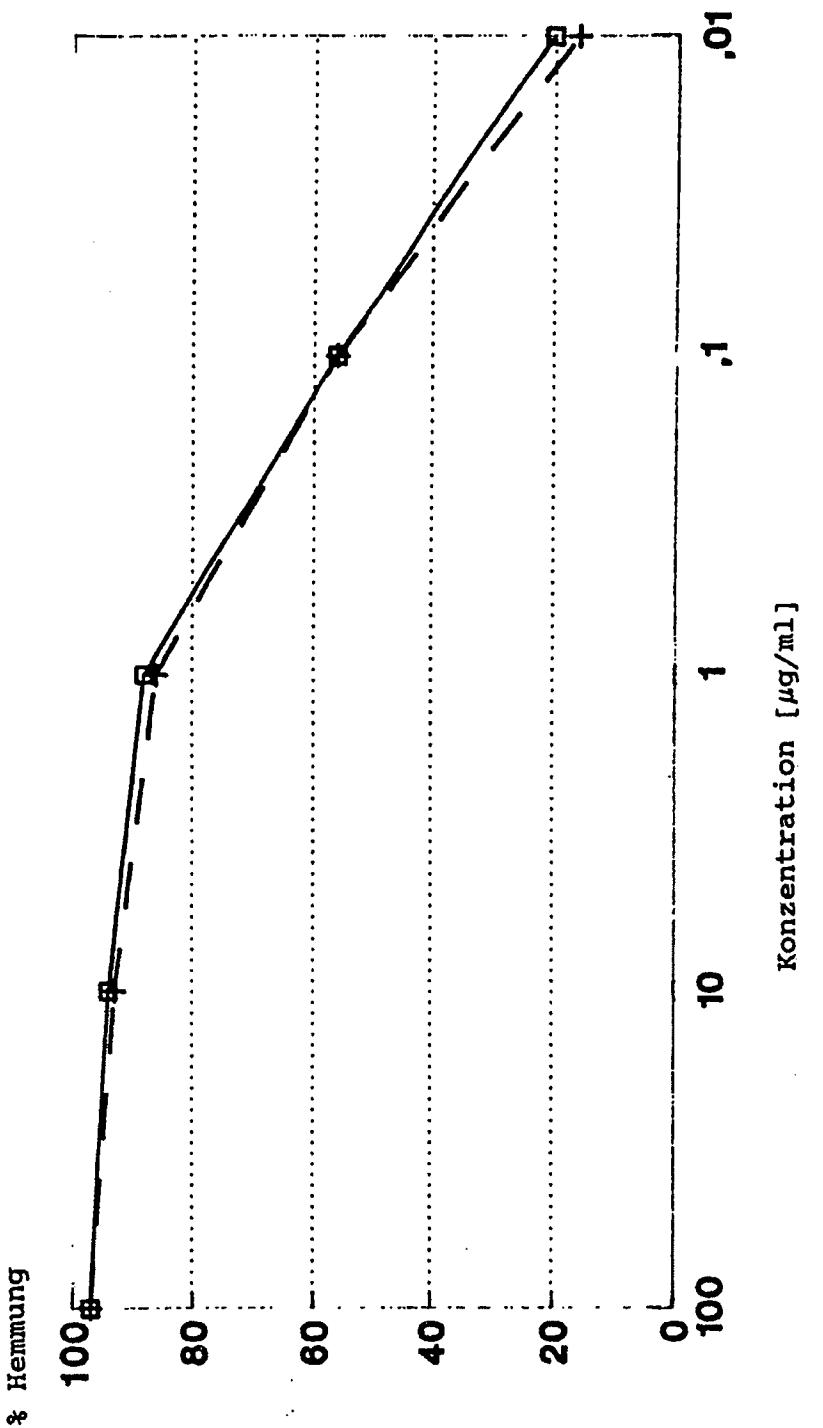


Fig.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/02905

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.⁵ A 61 K 39/395, C 07 K 15/28, C 12 P 21/08, C 12 N 5/00
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ A 61 K, C 07 K, C 12 P, C 12 N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X | EP, A2, 0 287 397 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA). 19 October 1988 (19.10.88) claims 1,2 claims 1,2,6-8 ----- | 3,4 |
| A | EP, A2, 0 459 450 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 4 December 1991 (04.12.91) claims ----- | 1,2 1-4 |
| A | BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, volume 167, No. 3, 1990, K. TAKAYAMA et al. "Monoclonal Antibodies Against Human Synovial Phospholipase A2" pages 1309 - 1315, page 1309 ----- | 3,4 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Date of the actual completion of the international search 16 March 1993 (16.03.93) | Date of mailing of the international search report 26 March 1993 (26.03.93) |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office Facsimile No. | Authorized officer Telephone No. |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 92/02905

| I. KLASSEKLAFFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ⁶ | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Nach der internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int.Cl ⁵ A 61 K 39/395, C 07 K 15/28, C 12 P 21/08, C 12 N 5/00 | | |
| II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE | | |
| Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷ | | |
| Klassifikationssystem | Klassifikationssymbole | |
| Int.Cl. ⁵ | A 61 K, C 07 K, C 12 P, C 12 N | |
| Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸ | | |
| III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹ | | |
| Art* | Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹² | Betr. Anspruch Nr. ¹³ |
| X | EP, A2, 0 287 397 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 19 Oktober 1988 (19.10.88), Ansprüche 1,2. Ansprüche 1,2,6-8. -- | 3,4 |
| A | EP, A2, 0 459 450 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 04 Dezember 1991 (04.12.91), Ansprüche. -- | 1,2 |
| A | EP, A2, 0 459 450 (SHIONOGI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 04 Dezember 1991 (04.12.91), Ansprüche. -- | 1-4 |
| A | BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Band 167, Nr. 3, 1990, K. TAKAYAMA et al. "Monoclo- nal Antibodies Against Human Synovial Phospholipase A2" | 3,4 |
| <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> | | |
| IV. BESCHEINIGUNG | | |
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts | |
| 16 März 1993 | 26 MAR 1993 | |
| Internationale Recherchenbehörde | Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten | |
| Europäisches Patentamt | WOLF e.h. | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/EP 92/02905

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

| Art * | Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| | Seiten 1309-1315, Seite 1309. ----- | |

ANHANG

zum internationalen Recherchenbericht über die internationale Patentanmeldung Nr.

ANNEX

to the International Search Report to the International Patent Application No.

PCT/EP92/02905 SAE 67778

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben. Diese Angaben dienen nur zur Unter-richtung und erfolgen ohne Gewähr.

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Office is in no way liable for these particulars which are given merely for the purpose of information.

ANNEXE

au rapport de recherche international relatif à la demande de brevet international n°

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents de brevets cités dans le rapport de recherche international visée ci-dessus. Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office.

| In Recherchenbericht angeführtes Patentdokument Patent document cited in search report Document de brevet cité dans le rapport de recherche | Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication | Mitglied(er) der Patentfamilie Patent family member(s) Membre(s) de la famille de brevets | Datum der Veröffentlichung Publication date Date de publication |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| EP A2 287397 | 19-10-88 | EP A3 287397 JP A2 63258898 US A 4978609 | 22-11-90 26-10-88 18-12-90 |
| EP A2 459450 | 04-12-91 | EP A3 459450 JP A2 4036193 | 11-12-91 06-02-92 |